

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61L 25/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/15341 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. September 1992 (17.09.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH92/00036 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Februar 1992 (21.02.92) (30) Prioritätsdaten: 0606/91-6 28. Februar 1991 (28.02.91) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PENTAPHARM AG [CH/CH]; Engelgasse 109, CH-4052 Basel (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLOMBÄCK, Birger [SE/SE]; Tomtebgatan 31, S-113 38 Stockholm (SE). HESSEL, Birgit [SE/SE]; Rådisvägen 139, S-162 41 Vällingby (SE). OLSSON, Per [SE/SE]; Vikingegatan 11, S-113 42 Stockholm (SE). STRÖMBERG, Lennart [SE/SE]; Byvägen 16, S-133 34 Saltsjöbaden (SE). SWEDENBORG, Jesper [SE/SE]; Danderydsvägen 103, S-182 65 Djursholm (SE). STOCKER, Kurt [CH/CH]; Blumenrain 14, CH-4147 Aesch (CH).		(74) Anwalt: BRAUN, André; Murtengasse 5, CH-4051 Basel (CH). (81) Bestimmungsstaaten: AT, AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH, CH (europäisches Patent), CI (OAPI Patent), CM (OAPI Patent), CS, DE, DE (europäisches Patent), DK, DK (europäisches Patent), ES, ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB, GB (europäisches Patent), GN (OAPI Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), MG, ML (OAPI Patent), MN, MR (OAPI Patent), MW, NL, NL (europäisches Patent), NO, PL, RO, RU, SD, SE, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: ADHESIVE FOR BONDING BIOLOGICAL TISSUE (54) Bezeichnung: KLEBER ZUM VERKLEBEN VON BIOLOGISCHEN GEWEBEN (57) Abstract Disclosed is an adhesive for bonding biological tissue, in particular human body tissue. The adhesive contains fibrinogen, a substance capable of supplying calcium ions, blood-coagulating factor XIIIa and, as a fibrinogen-splitting substance, a snake-venom enzyme. (57) Zusammenfassung Kleber zum Verkleben von biologischen Geweben, insbesondere menschlichen Körpergeweben. Der Kleber enthält Fibrinogen, einen Calciumionen liefernden Stoff, Blutgerinnungsfaktor XIIIa und als Fibrinogen-spaltendes Enzym ein Schlangengiftenzym.		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabun	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Kleber zum Verkleben von biologischen Geweben

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Fibrinogenhaltigen Kleber, der zum Verkleben von biologischen Geweben, insbesondere menschlichen Körpergeweben, bestimmt ist.

5 Die physiologische Wundheilung beruht auf einer komplexen, in mehreren Phasen ablaufenden Wechselwirkung zwischen Proteinen, Zellen und Korpuskeln des Blutes einerseits und Strukturproteinen, Polysacchariden und Zellen des Gewebes andererseits und führt schliesslich zum Schluss der
10 Oberfläche und zur Ausfüllung der Wunde mit Gewebe.

Zur Verbindung und Wiederherstellung von Gewebestrukturen, die durch chirurgische Eingriffe, traumatische oder pathologische Einflüsse unterbrochen wurden, gelangen oft mechanische Massnahmen, wie z.B. Näh-, Klemm-, Nagel- und
15 Schraubtechniken mittels natürlicher oder synthetischer, organischer oder anorganischer Hilfsmittel, zur Anwendung.

In neuerer Zeit wurden ausser diesen mechanischen Verfahren auch synthetische chemische Klebesysteme zur Verbindung von Geweben untersucht. Es gelangten vor allem
20 Kunstharzkleber auf Basis von Polyacrylsäureestern, wie z.B. 2-Cyanoacrylsäure-isobutylester (BucrylatTM), zur Anwendung.

- 2 -

Polyacrylkleber ergeben jedoch eine körperfremde, starre Klebezone, die sich nicht der Plastizität und Elastizität weicher Gewebe und Organe anpasst und durch mechanische Reizung Entzündungen verursacht. Die Anwendung derartiger 5 Kunsthartzkleber beschränkt sich darum heute auf den Bereich der Zahnmedizin und wenige spezielle orthopädisch-chirurgische Indikationen.

Um die genannten Nachteile der Kunsthartzkleber zu überwinden, wurde versucht, an der physiologischen Wundheilung beteiligte Proteine als Wundklebemittel einzusetzen. So 10 setzt sich ein Handelsprodukt (Tissucol^R Kit, Immuno AG, Wien, Oesterreich) aus A) sogenanntem Cryopräzipitat von Humanblut, einem Gemisch von plasminogenhaltigem Fibrinogen, Fibronectin und als inaktives Proenzym vorliegendem Gerinnungsfaktor XIII, B) Rinderthrombin, C) Aprotininlösung und 15 D) Calciumchloridlösung zusammen. Die Komponenten A und B sind Lyophilisate, welche vor der Anwendung in Wasser, unter dosiertem Zusatz der Komponenten C bzw. D, gelöst werden. Die zähflüssige, 75 bis 115 mg gerinnbares Protein pro ml 20 enthaltende Lösung A/C und die, je nach Anwendung, 4 bis 500 Einheiten Thrombin enthaltende Lösung B/D werden nun entweder simultan oder nacheinander auf die Wundfläche aufgetragen und polymerisieren gelassen. Das im System enthaltene Thrombin katalysiert die Abspaltung von Fibrinopeptiden (A 25 und B) aus Fibrinogen und die Bildung von Fibrinmonomeren sowie die Aktivierung des fibrinstabilisierenden Faktors XIII. Je nach eingesetzter Thrombindosis entsteht innert weniger Sekunden bis einigen Minuten eine adhäsive, den Wunddefekt verschliessende Klebezone, welche je nach beige- 30 mengter Aprotininkonzentration mehr oder weniger rasch fibrinolytisch abgebaut und aufgelöst wird.

Das in Klebesystemen enthaltene bovine Thrombin ist ein instabiles, hitzeempfindliches Enzym, in welchem weder durch physikalische noch durch chemische Massnahmen Viren und 35 Prionen inaktiviert oder abgeschwächt werden können, ohne dessen Enzymaktivität zu zerstören, und welches darum Träger von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) und von

- 3 -

säugetierpathogenen Viren sein kann. Bovines Thrombin ist ausserdem ein starkes Antigen, welches anaphylaktische Reaktionen im menschlichen Organismus auslösen kann. Humanes Thrombin ist zwar nicht antigen, birgt aber die Gefahr einer Übertragung von Hepatitis- und HIV-Viren in sich, da es wegen seiner Empfindlichkeit weder durch Hitzeeinwirkung noch durch chemische Massnahmen von Viren befreit werden kann. Im Blut liegt schliesslich ein Hemmstoff für Thrombin, das sogenannte Antithrombin III vor, welches das Thrombin des Klebers neutralisieren kann. Da dieser Thrombin-hemmende Effekt von Antithrombin III durch das Antikoagulans Heparin potenziert wird, kann ein thrombinhaltiger Kleber bei Patienten, die unter Heparinbehandlung stehen, nicht oder nur unter Einsatz grosser Thrombinkonzentrationen angewendet werden. Je höher aber die Thrombinkonzentration des Klebers, desto grösser ist das Risiko anaphylaktischer und thromboembolischer Reaktionen. Von der Klebestelle abwanderndes Thrombin löst im zirkulierenden Blut eine Aktivierung der Plättchen-Adhäsions-, Aggregations- und Freisetzungs-Reaktionen aus und wirkt deshalb thrombogen. Um ein Risiko anaphylaktischer und thromboembolischer Komplikationen auf ein Minimum zu reduzieren, muss bei der Applikation thrombinhaltiger Wundkleber sorgsam darauf geachtet werden, dass Thrombin von nicht zu versorgendem Gewebe der Wundumgebung ferngehalten wird. Keinesfalls darf Thrombin in die Blutbahn gelangen, weil es durch seine vielfältige Aktivatorwirkung auf Blutplättchen, Plasmagerinnungsfaktoren und Endothelzellen Thrombosen und Embolien auslösen kann. Auch bei sorgfältiger Applikation bildet jedoch die Klebestelle ein Thrombindepot, welches intravasale Gerinnung auslösen und gegen welches der Organismus immunologische Abwehrreaktionen richten kann. Thrombinhaltige Fibrinkleber sind aus diesen Gründen nur mit bedeutenden Einschränkungen anwendbar und eignen sich keinesfalls für einen Einsatz bei chirurgischen Eingriffen an Blutgefässen.

Schliesslich bedingt die geringe Haltbarkeit von gelöstem Thrombin dessen Verwendung in lyophilisierter Form,

- 4 -

was zu einer beachtlichen Verteuerung des Klebesystems führt und dessen Anwendung durch einen zusätzlichen Auflösungs-
vorgang kompliziert.

Ein gemeinsamer Nachteil aller Kleber, deren koagu-
5 llerbares Protein in Form von Cryopräzipitat eingeführt
wird, liegt in ihrer zähflüssigen Konsistenz, welche eine
präzise Applikation verunmöglicht. Derartig zähflüssige oder
pastöse Kleber eignen sich nicht für microchirurgische
Anwendungen oder für Operationen, welche durch das Endoskop
10 ausgeführt werden.

Es wurde nun versucht, die Nachteile thrombinhaltiger
Fibrinkleber dadurch zu umgehen, dass man an Stelle von
Thrombin ein Fibrinogen-spaltendes Enzym aus einem Schlan-
gengift als Polymerisationsauslöser, auf eine fibrinogen-
15 haltige Cryopräzipitat-Lösung einwirken lässt. Im Gegensatz
zu Thrombin, welches aus Fibrinogen die Fibrinopeptide A und
B abspaltet und dadurch eine End-zu-End und Seite-zu-Seite
Polymerisation von Fibrin auslöst, katalysieren aber diese
Schlangengiftenzyme spezifisch die ausschliessliche Abspal-
20 tung von Fibrinopeptid A unter Bildung eines fragilen, für
Klebezwecke untauglichen Fibrins.

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, dass die
mittels des Schlangengiftenzym Batroxobin in Anwesenheit
von Calciumionen ausgelöste Abspaltung von Fibrinopeptid A
25 in einer Lösung von gereinigtem humanem Fibrinogen zur
Entstehung eines Co-polymerisates mit hervorragenden bio-
physikalischen Eigenschaften führt, wenn dem Gemisch akti-
vierter Faktor XIII (Faktor XIIIa) zugesetzt wird. Unter
Verwendung von gereinigtem humanem Fibrinogen, gereinigtem
30 humanem Fibronectin und gereinigtem, humanem aktiviertem
Faktor XIII können Gemische mit verschiedenen Viskositäten
und auch Lyophilisate, welche nach Auflösung dünnflüssige,
einfach und präzise applizierbare Komponenten eines Klebe-
systems liefern, hergestellt werden.

35 Die vorliegende Erfindung betrifft einen Kleber zum
Verkleben von menschlichen Körpergeweben, welcher
(a) Fibrinogen,

- 5 -

- (b) ein Fibrinogen-spaltendes Enzym,
- (c) einen Calciumionen liefernden Stoff und
- (d) Blutgerinnungsfaktor XIII

enthält und dadurch gekennzeichnet ist, dass er den Blutgerinnungsfaktor XIII in aktivierter Form (Faktor XIIIa) und als Fibrinogen-spaltendes Enzym ein Fibrinogen-spaltendes Schlangengiftenzym enthält.

Fibrinogen-spaltende Schlangengiftenzyme können aus den Giften der Schlangenfamilie Viperidae gewonnen werden. Bis heute sind 27 Fibrinogen-spaltende Enzyme aus Schlangengiften der Schlangenfamilie Viperidae isoliert und charakterisiert worden (H. Pirkle and K. Stocker, Thrombin-like enzymes from snake venoms: An inventory. Thromb. Haemostas., in press). Zwei dieser Enzyme, Ancrod und Batroxobin, werden in der Humanmedizin als antithrombotische Arzneimittel zur therapeutischen Defibrinogenierung eingesetzt. Sie sind in Lösung sehr stabil, werden durch Antithrombin III auch in Anwesenheit von Heparin nicht gehemmt, sind für den menschlichen Organismus als sehr schwache Antigene gut verträglich und wirken spezifisch nur auf Fibrinogen ein. Andere Gerinnungsfaktoren oder Thrombozytenfunktionen werden durch diese beiden Enzyme weder aktiviert noch gehemmt. Thromboembolische Nebenwirkungen sind praktisch ausgeschlossen. Ferner besteht bei diesen von Reptilienarten stammenden Enzymen keine Kontaminationsgefahr durch Säugetier-pathogene Viren oder Prionen.

Der erfindungsgemässe Kleber eignet sich darum nicht nur zur Anwendung in den herkömmlichen Indikationen für Fibrinkleber, sondern auch bei endoskopischen Operationen beispielsweise im Gelenkbereich und im besonderen bei gefässchirurgischen Eingriffen.

Die Klebekapazität des erfindungsgemässen Klebers kann durch Zugabe von Fibronectin zu der Klebermischung wesentlich erhöht werden.

Es wurde ferner gefunden, dass die Festigkeit der Gewebeverklebungen beträchtlich verstärkt werden kann, wenn der Klebermischung ein Reduktionsmittel beigemischt wird.

- 6 -

Geeignete Reduktionsmittel sind vorzugsweise Thiolverbindungen wie Cystein, Dithiothreitol, Dithioerythrit, Glutathion, Thioredoxin oder ähnliche Verbindungen. Die verstärkende Wirkung dieser Thiolverbindungen beruht möglicherweise auf ihrer stabilisierenden Wirkung auf die aktive, reduzierte Form von Faktor XIIIa und möglicherweise auch auf einer Auslösung von Disulfid-Austauschreaktionen im polymerisierten Klebermaterial. Man kann beispielsweise Dithiothreitol in Konzentrationen von 0,1 - 1 mM pro Liter des Gesamtklebers verwenden.

Der Gerinnungsfaktor XIII wird vor der Zugabe zum Klebergemisch mittels Thrombin, Trypsin oder dem Schlangengiftenzym Thrombocytin aktiviert. Die Aktivierung kann folgendermassen durchgeführt werden: 10 ml einer Lösung von 500 Einheiten Faktor XIII, in gepufferter (pH 7,4) 0,05 molarer Natriumchloridlösung werden mit 100 Einheiten Thrombin oder 20 Einheiten Thrombocytin inkubiert. Die zur Aktivierung von Faktor XIII verwendeten Enzyme werden vorzugsweise durch Fixierung an einen unlöslichen Träger, wie z.B. Sepharose 4B (Pharmacia, Schweden), insolubilisiert. Nach vollendeter Aktivierung können die insolubilisierten Enzyme einfach durch Zentrifugation oder Filtration vom aktivierten Faktor XIII abgetrennt werden.

Die in Lösung gut haltbaren Schlangengiftenzyme brauchen nicht lyophilisiert zu werden, was die Anwendung des Klebers vereinfacht und seine Herstellungskosten reduziert. Die Fibrinogen-spaltenden Schlangengiftenzyme können in wässrigen Elektrolytlösungen, z.B. in Natriumchlorid- oder Calciumchloridlösungen, gelöst werden. Weil die ohnehin nur wenig antigenen Schlangengiftenzyme durch Antithrombin selbst in Anwesenheit von Heparin nicht gehemmt werden, können sie sogar bei Patienten, die unter Heparinbehandlung stehen, in sehr niedriger Dosis eingesetzt werden, wodurch die Gefahr anaphylaktischer Reaktionen praktisch ausgeschlossen wird. Da schliesslich die Schlangengiftenzyme weder die endogene oder exogene Prothrombinaktivierung bewirken noch die Adhäsions-, Aggregations- und

Freisetzungsreaktionen bei Blutplättchen auslösen, ist bei der Anwendung des erfindungsgemässen Klebers auch eine Gefahr thromboembolischer Komplikationen ausgeschlossen.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung Fibrinogen-spaltenden der Schlangengiftenzyme eignen sich die Giftdrüsensekrete von solenoglyphen Schlangen (also solchen mit beweglichen, röhrenförmigen Giftzähnen), die der Familie der Vipern (Viperidae), insbesondere dem Tribus der Grubenottern (Crotalinae) angehören. Insbesondere eignet sich das Gift der Bothrops atrox, der Bothrops moojeni und der Calloselasma (Agkistrodon) rhodostoma, aus welchem die bereits in der Humanmedizin anwendbaren Fibrinogen-spaltenden Enzyme Batroxobin und Ancrod hergestellt werden (Stocker, K. Defibrinogenation with thrombin-like snake venom enzymes, in Fibrinolytics and Antifibrinolytics, Markwardt, F., Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1978, 451).

Die im erfindungsgemässen Kleber verwendeten humanen Proteine Fibrinogen und Faktor XIII werden aus Blut von kontrollierten Spendern gewonnen und durch an sich bekannte chemische und physikalische Verfahren zur Virusinaktivierung behandelt.

Der erfindungsgemässe Kleber kann im gebrauchsfertigen Zustand beispielsweise 2 bis 40 mg Fibrinogen pro ml, 0,5 bis 10 mg Fibronectin pro ml, 0,4 bis 2 Einheiten aktivierten Faktor XIII pro ml, 5 bis 20 mMol Calciumchlorid pro L, 0,1 mMol Natriumchlorid pro L, 0,05 mMol Pufferionen pro L, z.B. Tris-hydroxymethylaminomethan (TRIS), und 1 bis 100 KIE-Einheiten Aprotinin pro ml enthalten. Unmittelbar vor der Applikation solcher Gemische auf zu verklebendes Gewebe wird die Polymerisation und Gelierung des Fibrinogens durch Zusatz einer wässrigen Batroxobinlösung ausgelöst. Die Batroxobinkonzentration der Lösung wird derart eingestellt, dass der gebrauchsfertige Gesamtkleber 5 - 100 Einheiten Batroxobin enthält. Mit Batroxobinmengen von 10 bis 50 Einheiten pro ml Klebergemisch werden Gelierungszeiten von 10 bis 30 Sekunden erzielt.

Der erfindungsgemässe Kleber kann beispielsweise aus drei separaten, bei Gebrauch des Klebers zu mischenden ampulli-erten Komponenten zusammengesetzt sein. Ampulle 1 enthält 20 mg Fibrinogen, 1 mg Fibronectin, 1 Einheit (KIE) Aprotinin und 1 Einheit aktivierten Faktor XIII in lyophilisierter Form. Ampulle 2 enthält 1 ml 0,02 molare Calciumchloridlösung, die als Lösungsmittel für den Inhalt der Ampulle 1 dient. Ampulle 3 enthält 0,2 ml einer wässrigen Lösung, die 50 Batroxobin-Einheiten und 4 µg Dithiothreitol per ml enthält. Bei Gebrauch des Klebers wird der Inhalt der Ampulle 1 im Inhalt der Ampulle 2 gelöst. Die Lösung wird in eine sterile Injektionsspritze aufgesogen. In eine zweite Injektionsspritze wird die Lösung aus Ampulle 3 aufgenommen. Man trägt die Inhalte beider Spritzen simultan auf die zu verklebenden Gewebeflächen und vereinigt die letzteren unter angemessener Kraftanwendung.

Die Eigenschaften der erfindungsgemässen Klebergemische können einerseits durch chemische und physico-chemische Prüfungen des erzeugten Fibrins und andererseits durch Messungen mechanischer Parameter, wie Steifheit, Zugfestigkeit und Adhäsivität des Klebers gegenüber verschiedenen Geweben untersucht werden.

Chemische Methoden zur Untersuchung der Klebereigenschaften beinhalten die Bestimmung der Proteinmasse durch Aminosäurenanalyse und des Quervernetzungsgrades durch elektrophoretische Prozeduren. Durch turbidometrische Messungen und durch Bestimmung der Permeabilität nach Blombäck et al. (Biochim. Biophys. Acta 997, 96-110, 1989) können die Porosität und die mittlere Dicke der Fibrinfasern in Polymerisaten verschiedener Klebergemische ermittelt werden.

Zur Messung der mechanischen Eigenschaften von Klebergemischen wurde die nachfolgend beschriebene neue Methode entwickelt: Eine kreisförmige Scheibe eines ausgewählten biologischen Gewebes wird auf das eine Ende eines Metallzylinders montiert. Dieses Zylinderende ist mit einem Metallnetz von definierter Maschenweite bedeckt, um die

- 9 -

aufgebrachte Gewebeprobe daran zu hindern, in den Zylinder hineinzugleiten. Das andere Zylinderende ist mit einer dichten Metallplatte hermetisch verschlossen. Auf die gleiche Weise wird eine zweite kreisförmige Scheibe desselben biologischen Gewebes auf einen zweiten Metallzylinder montiert. Der zu prüfende Kleber wird nun auf die freiliegende Oberfläche der einen Gewebescheibe appliziert, worauf die beiden auf ihren Metallzylindern montierten Gewebescheiben fest gegeneinander gepresst werden. Nach erfolgter Polymerisation des Fibrinogens werden beide Zylinder unter Vakuum gesetzt, wodurch die beiden Gewebeproben mit bekannter Kraft gegen die auf den Zylinderenden angebrachten Metallnetze gesogen werden. Dann wird auf beide Metallzylinder eine Zugkraft bei konstanter Geschwindigkeit ausgeübt und die Zugbewegung über eine mit dem System verbundene Kraftmesszelle digital und graphisch registriert. Diese Aufzeichnungen objektivieren die mechanischen Eigenschaften der zwischen dem biologischen Gewebe und dem Kleber entstandenen mechanischen Verbindung. Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des Klebers selbst gelangt das selbe Testprinzip zur Anwendung, jedoch werden die Gewebeproben durch kreisförmige Scheiben aus polymerisiertem Kleber ersetzt.

Beispiel 1

Es wurde eine aus 3 separaten Komponenten bestehende Kleberkombination in der nachfolgend beschriebenen Weise hergestellt:

Komponente I: 2 g plasminogenfreies, menschliches Fibrinogen, 0,1 g menschliches Fibronectin, 100 Einheiten Faktor XIIIa und 100 Kallikreininhibitor-Einheiten (KIE) Aprotinin wurden in 100 ml einer wässrigen, sterilen, pyrogenfreien Pufferlösung, die 0,05 Mol pro L Tris-hydroxymethylaminomethan, 0,1 Mol pro L Natriumchlorid und 1 mMol pro L Ethylendiamintetraessigsäure enthielt und ein pH von 7,4 aufwies, aufgelöst. Die Lösung wurde durch einen

- 10 -

Membran-Bakterienfilter mit einer Porengrösse von 0,2 μ sterilfiltriert, unter sterilen Bedingungen in Portionen von je 1,0 ml in 10 ml-Ampullen abgefüllt und unter sterilen Bedingungen lyophilisiert. Die Ampullen wurden anschliessend
5 verschweisst.

Komponente II: Als Lösungsmittel für die lyophilisierte Komponente I wurde eine wässrige 0,02 molare Calciumchloridlösung zubereitet. Die Lösung wurde durch einen Membranfilter faserfrei filtriert, in Ampullen zu je 1 ml abgefüllt
10 und während 30 Minuten im Autoklaven bei 120°C sterilisiert.

Komponente III: Zur Aktivierung der durch Auflösung von Komponente I in Komponente II erhaltenen, Calciumionen enthaltenden Proteinlösung wurden zwei Batroxobinlösungen (IIIa und IIIb) mit zwei die Polymerisation des Fibrinogens
15 unterschiedlich schnell katalysierenden Batroxobinkonzentrationen verwendet. Zur Erzielung einer langsamen Polymerisation bestand die Komponente IIIa aus 0,2 ml einer sterilen wässrigen Lösung von 10 Einheiten Batroxobin und 4 μ g Dithiothreitol pro ml und zur Erzielung einer schnellen
20 Polymerisation enthielt Komponente IIIb 0,2 ml einer Lösung von 50 Einheiten Batroxobin und 4 μ g Dithiothreitol pro ml. Die Batroxobin/Dithiothreitol-Lösungen IIIa und IIIb wurden durch Sterilfiltration sterilisiert und unter aseptischen Bedingungen in Ampullen mit je 0,2 ml abgefüllt.

Bei Gebrauch des Klebers löste man die Komponente I
25 (Lyophilisat) in der Komponente II (Lösungsmittel) und gab der Lösung die Komponente III zu. Der gebrauchsfertige Kleber enthielt pro ml 0,0167 g Fibrinogen, 0,0008 g Fibronectin, 0,833 Einheit Faktor XIIIa, 0,833 KIE Aprotinin,
30 0,0018 g CaCl_2 , 8,333 bzw. 33,333 Einheiten Batroxobin und 0,66 μ g Dithiothreitol.

Beispiel 2

Es wurde die Wirkung von Thrombin und Batroxobin auf Fibrinogen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Faktor XIIIa
35 untersucht.

- 11 -

Eine Lösung von Faktor XIII-haltigem Fibrinogen (1,5 mg/ml in TNE-Puffer enthaltend 0,05 Mol TRIS, 0,1 Mol NaCl und 1 mMol EDTA pro L) wurde in Gegenwart von Calciumchlorid (20 mMol pro L Reaktionsgemisch) während 15 Stunden mit 5 Thrombin bzw. Batroxobin inkubiert. Das entstandene Gerinnsel wurde durch Turbiditäts- und Viskositätsmessungen geprüft. Die Porosität, (μ), das Verhältnis Fasermasse zu Faserlänge und Faserdurchmesser, wurde berechnet. In denjenigen Experimenten, in welchen die Gerinnung mittels Batroxobin ausgelöst wurde, setzte man dem Reaktionsgemisch 10 aktivierten Faktor XIII (FXIIIa) zu. Die Ergebnisse der Turbiditäts- und Viskositätsmessungen, ausgedrückt durch die errechnete Gerinnselporosität (μ) sind in Tabelle I zusammengestellt.

15

Tabelle I

Probe	Thrombin Einheiten /ml	Batroxobin Einheiten /ml	FXIIIa Einheiten /ml (zugesetzt)	μ Dalton/ cm x 10 ⁻¹²
20 Fbg + Ba	0	0,9	0	10,0
Fbg + Ba + FXIIIa	0	0,9	0,4	3,0
Fbg + Ba + FXIIIa	0	0,9	0,4	3,0
Fbg + Thr	1	0	0	4,5

25 Fbg = Fibrinogen, Ba = Batroxobin, Thr = Thrombin, Fibrinogen enthielt 0,4 Einheiten FXIII pro ml.

Die in Tabelle I zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass die Porosität (μ = Verhältnis Fasermasse zu Faserlänge und Faserdurchmesser) der mittels Batroxobin erhaltenen Gele kleiner ist als diejenige der mittels 30 Thrombin erhaltenen Gele und dass durch Zugabe von Faktor XIIIa die Porosität der mittels Batroxobin erhaltenen Gele

- 12 -

wesentlich verringert wird und dadurch die Gele verdichtet sind.

Beispiel 3

Verklebung von Endotheloberflächen - Einfluss von Fibrinogen, Fibronectin und Faktor XIIIa auf die maximale Zugfestigkeit

Endothelproben wurden aus Schweineaorta gewonnen. Scheiben von 1 cm² Durchmesser wurden aus der Aortawand herausgeschnitten. 100 µl von mit Batroxobin aktiviertem Kleber (Tabelle II) wurden auf die Endotheloberfläche einer
10 Scheibe aufpipettiert, worauf sofort eine zweite Aortascheibe auf die Kleberschicht derart aufgebracht wurde, dass deren Endotheloberfläche dem Kleber zugekehrt war. Nachdem der auf diese Weise zubereitete Aorta-Kleber-Aorta-"Sand-
15 wich" während einer Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war, wurde die Zugfestigkeit (N/cm²) der Klebestelle gemessen. Die spezifische Zusammensetzung der Kleberproben bezüglich Fibrinogen, Fibronectin, FXIIIa und aktivierendes Enzym ist in Tabelle II angegeben. In allen Fällen (mit
20 Ausnahme des Kontrollversuches) wurden dem Kleber Calciumchlorid in einer Endkonzentration von 20 mMol pro l und Dithiothreitol in einer Konzentration von 0,5 mMol pro l zugesetzt. Für den Kontrollversuch wurden Aortascheiben ohne Kleber vereinigt. Bei der Prüfung des Verklebungsvermögens
25 (N/cm²) wurde nachgewiesen, dass Fibrinogen, Fibronectin und FXIIIa wesentliche Komponenten des mittels Batroxobin polymerisierten Klebers darstellen und dass das Endothel-Verklebungsvermögen dieser Mischung mindestens ebenso gut ist wie dasjenige des mittels Thrombin aktivierten Klebers.

- 13 -

Tabelle II

Versuch	Zusammensetzung des Klebers					Max. Zug- festigkeit (N/cm ²)
	Fbg mg/ml	FN mg/ml	FXIIIa Einhei- ten/ml	Ba Einhei- ten/ml	Thr Einhei- ten/ml	
5						
1	20	2	1,6	5,4	0	8,8
2	20	0	1,6	5,4	0	< 2,0
3	20	2	0	5,4	0	< 2,0
4	20	2	1,6	0	4	3,6
10 Kontrolle	0	0	0	0	0	< 2,0

Fbg = Fibrinogen, FN = Fibronectin, Ba = Batroxobin, Thr = Thrombin

Beispiel 4

Verklebung von Haut - Einfluss der Variation der Fibrinogen- und Dithiothreitol-Konzentration auf die maximale Zugfestigkeit

Zur Durchführung dieser Versuche wurde Schweinehaut verwendet. Anästhesierten Schweinen wurden mittels eines Dermatoms 1 mm dicke Hautlappen entnommen, aus welchen Scheiben ausgeschnitten wurden. Die Scheiben wurden wie in Beispiel 3 beschrieben zusammengeklebt, wobei mittels Batroxobin aktivierte Klebergemische mit unterschiedlicher Fibrinogen- und Fibronectinkonzentration, ohne bzw. mit Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 0,5 mM) zu Prüfung gelangten. Bei den in Tabelle III zusammengefassten Versuchen betrug die Gerinnungszeit des aktivierten Klebers 30 bis 40 Sekunden. Die Klebefestigkeit, ausgedrückt als maximale Zugfestigkeit (N/cm²), wurde geprüft.

- 14 -

Tabelle III

Ver- such	Fbg mg/ml	DTT mM	FN mg/ml	FXIIIa Einhei- ten/ml	Ba Einhei- ten/ml	Max. Zug- festigkeit (N/cm ²)	
5	1	20	0	2	1,6	22	> 9,0
	2	20	0	2	1,6	22	> 9,0
	3	20	0,5	2	1,6	22	> 9,0
	4	20	0,5	2	1,6	22	> 9,0
	5	10	0	1	1,6	22	5,0
10	6	10	0	1	1,6	22	5,0
	7	10	0,5	1	1,6	22	> 9,0
	8	10	0,5	1	1,6	22	> 9,0

Fbg = Fibrinogen, DTT = Dithiothreitol, FN = Fibronectin, Ba
= Batroxobin

Patentansprüche

1. Kleber zum Verkleben von biologischen Geweben, insbesondere menschlichen Körpergeweben, welcher
(a) Fibrinogen,
5 (b) ein Fibrinogen-spaltendes Enzym,
(c) einen Calciumionen liefernden Stoff und
(d) Blutgerinnungsfaktor XIII
enthält, dadurch gekennzeichnet, dass er den Blutgerinnungsfaktor XIII in aktivierter Form (Faktor XIIIa) und als
10 Fibrinogen-spaltendes Enzym ein Fibrinogen-spaltendes Schlangengiftenzym enthält.
2. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er als Fibrinogen-spaltendes Schlangengiftenzym ein aus den Giften der Schlangenfamilie Viperidae
15 gewonnenes Fibrinogen-spaltendes Enzym enthält.
3. Kleber gemäss Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass er das aus Bothrops atrox oder Bothrops moojeni gewonnene Schlangengiftenzym Batroxobin enthält.
4. Kleber gemäss Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass er das aus Agkistrodon rhodostoma gewonnene Schlangengiftenzym Ancrod enthält.
20
5. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er einen seine Klebekapazität erhöhenden Stoff, z.B. Fibronectin, enthält.
- 25 6. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er als Calciumionen liefernden Stoff Calciumchlorid oder Calciumgluconat enthält.
7. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er einen die Fibrinolyse hemmenden Stoff,
30 z.B. Aprotinin, Antiplasmin oder einen synthetischen Plasmin-Inhibitor, z.B. 2-Tosylamino-4-(4'-amidinophenyl)-buttersäureanilid, enthält.
8. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er ein die Festigkeit der Verklebung
35 erhöhendes Reduktionsmittel, z.B. eine Thiolverbindung, insbesondere Cystein, Dithiothreitol, Dithioerythrit,

Glutathion oder Thioredoxin, enthält.

9. Kleber gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er als Lösungsmittel eine gepufferte wässrige Elektrolytlösung enthält.

- 5 10. Kleber gemäss Patentanspruch 1, welcher aus 3 separaten, bei Gebrauch des Klebers zu mischenden Komponenten zusammengesetzt ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponente I Fibrinogen, Fibronectin, Faktor XIIIa und Aprotinin enthält, die Komponente II eine wässrige Calcium-
10 chloridlösung ist und die Komponente III eine wässrige Lösung von Batroxobin und Dithiothreitol ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CH 92/00036

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ A61L 25/00								
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; border: none;">Classification System</td> <td style="border: none;">Classification Symbols</td> </tr> </table> Int.Cl. ⁵ A61L ; A61K <div style="text-align: center; font-size: small;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols				
Classification System	Classification Symbols							
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 2px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; text-align: left; padding: 2px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; text-align: left; padding: 2px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;"> DE, A, 2 201 993 (PENTAPHARM) 10 August 1972 see claim 1P ----- </td> <td style="vertical-align: top; text-align: center; padding: 5px;">1</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	DE, A, 2 201 993 (PENTAPHARM) 10 August 1972 see claim 1P -----	1
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³						
A	DE, A, 2 201 993 (PENTAPHARM) 10 August 1972 see claim 1P -----	1						
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>								
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> Date of the Actual Completion of the International Search 24 March 1992 (24.03.92) </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> Date of Mailing of this International Search Report 3 April 1992 (03.04.92) </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 24 March 1992 (24.03.92)	Date of Mailing of this International Search Report 3 April 1992 (03.04.92)	International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer		
Date of the Actual Completion of the International Search 24 March 1992 (24.03.92)	Date of Mailing of this International Search Report 3 April 1992 (03.04.92)							
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer							

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. CH 9200036
SA 56578**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 24/03/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-2201993	10-08-72	CH-A- 586233	31-03-77
		AT-B- 321456	10-04-75
		AU-B- 476722	30-09-76
		AU-A- 3793972	19-07-73
		BE-A- 778226	19-07-72
		CA-A- 966418	22-04-75
		NL-A- 7200638	20-07-72
		SE-B- 407805	23-04-79
		US-A- 3849252	19-11-74

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC: Int.Kl. 5 A61L25/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	A61L ; A61K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
A	DE,A,2 201 993 (PENTAPHARM) 10. August 1972 siehe Anspruch 1P ---	1
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts	
24. MAERZ 1992	- 3. 06. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	PELTRE CHR.	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

CH 9200036
SA 56578

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

24/03/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-2201993	10-08-72	CH-A- 586233	31-03-77
		AT-B- 321456	10-04-75
		AU-B- 476722	30-09-76
		AU-A- 3793972	19-07-73
		BE-A- 778226	19-07-72
		CA-A- 966418	22-04-75
		NL-A- 7200638	20-07-72
		SE-B- 407805	23-04-79
		US-A- 3849252	19-11-74

EPO FORM P002

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.